Sonderdruck aus
Hoppe-Seyler's Zeitschrift für Physiologische Chemie
Walter de Gruyter & Co., Berlin 30

HOPPE-SEYLER'S Z. PHYSIOL. CHEM.
Bd. 350, S. 721—733, Juni 1969

Lactat-Dehydrogenase des Flußkrebses *Orconectes limosus*

Isolierung und Charakterisierung*

Von JÖRG URBAN**

Aus dem II. Zoologischen Institut der Freien Universität Berlin
(Direktor: Prof. Dr. K. Urich)

(Der Schriftleitung zugegangen am 4. März 1969)

Zusammenfassung:

1. Während verschiedener Stadien des Häutungszyklus ergab die Polyacrylamidgel-Elektrophorese von Organextrakten aus Antennendrüse, Herz, Hoden, Samenblase, Enddarm und Schwanzmuskel des Flußkrebses *Orconectes limosus* stets nur eine einzige Lactat-Dehydrogenase-Bande.

2. Aus Schwanzmuskeln wurde durch Säurefällung, Hydroxylapatit-Adsorption und fraktionierte Ammoniumsulfatfällung eine kristalline Lactat-Dehydrogenase-Präparation erhalten, die eine spezif. Aktivität von 103 U/mg Protein (25°C, pH 7,4, 3mM Pyruvat, 0,45mM NADH) hat.

3. Das Enzym ist in allen untersuchten Eigenschaften der M_4-Form der Wirbeltier-Lactat-Dehydrogenase sehr ähnlich, unterscheidet sich von dieser jedoch in der geringen Affinität zum Coenzym bei pH 8,1.
Das Molekulargewicht beträgt 131000 ± 4000.
Das Enzym ist stereospezifisch für L(+)-Lactat, inaktiv mit $NADP^{\oplus}$. Die Reaktion wird durch hohe Pyruvatkonzentrationen pH- und temperaturabhängig gehemmt. Das pH-Optimum der Pyruvat-Hydrogenierung liegt bei 5,0, das der Lactat-Dehydrogenierung bei pH 8,1.
Der Reaktionsmechanismus ist in der Klassifikation nach CLELAND *Ordered Bi Bi*, mit dem Coenzym als „*leading reactant*".

Summary: *Lactate dehydrogenase of the crayfish Orconectes limosus: Isolation and characterization.*

1. During variable stages of molting cycle the polyacrylamide gel electrophoresis of extractable protein from antennal glands, heart, testis, seminal vesicle, hindgut, and abdominal muscle showed only a single lactate dehydrogenase band.

2. The crayfish enzyme has been isolated from abdominal muscle by acid precipitation, hydroxyl apatite adsorption, and fractionating ammonium sulfate precipitation. The crystalline enzyme appears homogenous by electrophoretic criteria. Its specific activity was 103 U/mg protein (25°C, pH 7.4, 3mM pyruvate, 0.45mM NADH).

3. The enzyme is very similar in all examined properties to the M_4-form of the vertebrate lactate dehydrogenase. It differs, however, in its affinity to the coenzyme at pH 8.1.
The molecular weight was defined to be 131000 ± 4000.
The enzyme is specific to L(+)-lactate and $NAD^{\oplus}$ and not reactive with $NADP^{\oplus}$.
The reaction is inhibited by high pyruvate concentrations. The intensity of inhibition is dependent on pH and temperature. The pH optimum of pyruvate hydrogenizing is 5.0, that of lactate dehydrogenizing 8.1.
The results of product inhibition experiments indicate that the reaction mechanism for the enzyme is *Ordered Bi Bi* such that the coenzyme is the "*leading reactant*".

---

* Dissertat. d. Math.-Naturwiss. Fakultät d. Freien Univ. Berlin.

** Neue Anschrift: J. URBAN, Biochemisches Institut d. Univ., D-78 Freiburg, Hermann-Herder-Straße 7.

KELLER[1] konnte zeigen, daß Glykolyse und Citronensäurezyklus bei *Orconectes limosus (= Cambarus affinis)* nach dem von Wirbeltieren bekannten Schema ablaufen und offenbar eine ähnlich zentrale Rolle im energieliefernden Stoffwechsel spielen. In der vorliegenden Arbeit wird das den Endschritt der Glykolyse katalysierende Enzym, die Lactat-Dehydrogenase (L-Lactat: $NAD^{\oplus}$-Oxydoreduktase, EC 1.1.1.27), näher charakterisiert. Bei Wirbeltieren ist dieses Enzym sehr eingehend untersucht worden[2,3]. Entsprechende Arbeiten über Wirbellosen-Lactat-Dehydrogenase liegen bisher nicht vor. Die wenigen Untersuchungen zum Problem der Lactat-Dehydrogenase-Isoenzyme bei Wirbellosen (s. S. 724) beschränken sich auf die elektrophoretische Auftrennung von Rohextrakten. Im Gegensatz zu den Lactat-Dehydrogenase-Isoenzymen der Wirbeltiere[2,3] lassen sich jedoch bei den untersuchten Wirbellosen in keinem Fall zwei verschiedene Monomerentypen erkennen.

Durch einige unter den gleichen Testbedingungen an käuflicher Lactat-Dehydrogenase aus Rinderskelettmuskel (d. i. die M_4-Form[2]) durchgeführte Untersuchungen soll die Vergleichbarkeit der ermittelten Eigenschaften mit Literaturwerten geprüft werden.

Material und Methoden

1. Tiermaterial

Die Flußkrebse stammten aus der Havel bei Berlin-Spandau und wurden von Fischern bezogen. Nur reife, ca. 15 bis 30 g schwere, frisch gefangene Männchen wurden verwendet. Die Prüfung auf das Vorliegen von Isoenzymen umfaßte verschiedene Stadien des Häutungszyklus: Überwinterung, Vorhäutung (Gastrolithenbildung), unmittelbar, 24 Std. und einen Monat nach der Häutung.

2. Präparation der Gewebe

Die Tiere wurden durch Einwerfen in Heptan, das auf -60^0C gekühlt war, getötet. Die Organe wurden schnell entnommen, mit der 9fachen Menge eiskalter Sacharose- oder Pufferlösung versetzt und unter Eiskühlung 5 Min. homogenisiert. Im allgemeinen wurde 2 Std. bei 4^0C und $25000 \times g$ zentrifugiert.

3. Bestimmung der Enzymaktivitäten

Die Bestimmung der Enzymaktivitäten erfolgte nach der Methode des optischen Tests[4]. Die Extinktionsänderung $\triangle E_{366}$ wurde mit einem Eppendorf-Photometer(Fa. Netheler & Hintz) gemessen und von einem Kompensationsschreiber (Fa. Phillips) mit Linearisierungsglied (Netheler & Hintz) mindestens 5 Min. lang aufgezeichnet. Gewöhnlich fanden Küvetten von 1 cm Schichtdicke, für die Bestimmung der kinetischen Konstanten die geeigneteren 4-cm-Küvetten Verwendung. Als Extinktionskoeffizient für NADH bei 366 nm und 25^0C wurden 3,30 cm^2/μMol zugrunde gelegt[5]. Die spezif. Aktivität wird in mU bzw. U pro mg Protein[6], die Umsatzzahl in Mol Substratumsatz pro Min. und 131000 g Protein angegeben.

Alle verwendeten Chemikalien waren von p.a.-Qualität und stammten, wenn nicht anders angegeben, von der Fa. Merck/Darmstadt. L(+)Natriumlactat, D(−) Calciumlactat und Natriumpyruvat (alle Fa. Serva/Heidelberg) wurden im Vakuumexsikkator über Kieselgur bis zur Gewichtskonstanz getrocknet und ohne weitere Reinigung verwendet. NADH, $NAD^{\oplus}$, $NADP^{\oplus}$ sowie ein Arbeitsmuster* von nach WINER[7] höchstgereinigtem $NAD^{\oplus}$ wurden von der Fa. Boehringer Mannheim GmbH bezogen. Die Beobachtungen von FAWCETT et al.[8] fanden durch die Verwendung ausschließlich frischer Cofaktorlösungen Berücksichtigung. Die $NAD^{\oplus}$-Lösungen wurden unter ständigem Rühren mit Natronlauge vorsichtig neutralisiert.

4. Die Proteinbestimmung erfolgte im allgemeinen nach LOWRY et al.[9] mit dem FOLIN-CIOCALTEU-Phenol-Reagenz und 5fach umkristallisiertem Rinder-Serumalbumin als Bezugssubstanz. Das gereinigte Enzym wurde nach Ausfällen mit 10proz. Trichloressigsäure im KJELDAHL-Aufschluß mit NESSLER-Reagenz bestimmt[10].

---

[1] R. KELLER, Dissertat. Univ. Berlin 1964; R. KELLER, Z. vergl. Physiol. **50**, 119 [1965].

[2] Zusammenfassende Darstell. J. H. WILKINSON, Isoenzymes, E. & F. N. Spon Ltd., London 1965.

[3] H. SUND in T. P. SINGER, Biological Oxidations, p. 641, Interscience Publ., New York 1968.

* Das Präparat wurde von der Fa. Boehringer Mannheim GmbH freundlicherweise zur Verfügung gestellt.

[4] O. WARBURG u. W. CHRISTIAN, Biochem. Z. **286**, 81 [1936].

[5] H. J. HOHORST, Biochem. Z. **328**, 509 [1957].

[6] Enzyme Nomenclature in M. FLORKIN u. E. H. STOTZ, Comprehensive Biochemistry, 2. Aufl., Bd. 13, Elsevier Publ. Comp., Amsterdam.

[7] A. D. WINER, J. biol. Chemistry **239**, PC 3589 [1964].

[8] C. P. FAWCETT, M. M. CIOTTI u. N. O. KAPLAN, Biochimica biophysica Acta [Amsterdam] **54**, 210 [1961].

[9] O. H. LOWRY, N. J. ROSEBROUGH, A. L. FARR u. R. J. RANDALL, J. biol. Chemistry **193**, 265 [1951].

[10] R. A. CLEGHORN u. L. JENDRASSIK, Biochem. Z. **274**, 189 [1934].

UNIV. LEIDEN BIBL.

5. Elektrophorese

Die qualitative Polyacrylamidgel-Disk-Elektrophorese wurde nach der von ORNSTEIN[11] und DAVIS[12] entwickelten und von DIETZ und LUBRANO[13] vereinfachten Methode durchgeführt. Mehrere Versuche bestätigten, daß die Trennleistungen des ursprünglichen und des modifizierten Gelsystems übereinstimmten. Verwendung fanden 6,5proz. Gele von 5 cm Füllhöhe in Standard-Elektrophoreseröhrchen[12]. Die Elektrophorese lief im Kühlschrank 10 Min. bei 100 V, 3,2 mA/cm^2 und anschließend 140 Min. bei 200 V, 5,9 bis 4,6 mA/cm^2. Die Proteinfärbung erfolgte mit Amidoschwarz 10B. Die Dehydrogenase-spezifische Färbung wurde nach MARKERT und MØLLER[14] in der Modifikation nach DIETZ und LUBRANO[13], mit NAD$^{\oplus}$ und Lactat bzw. Äthanol als Substrate ausgeführt. Für die Analyse der gereinigten Präparation in Gegenwart von Harnstoff wurden dem Trenngel Harnstoff ad 8M und dem Elektrodenpuffer ad 10M zugesetzt. Das Auftragen des Untersuchungsmaterials erfolgte in 35proz. Saccharoselösung, die 10M Harnstoff enthielt, nach 10 Min. Vorinkubation bei 25°C. Da mit Harnstoff behandelte Lactat-Dehydrogenase offenbar zur Adsorption an Glas neigt[15], fanden für diese Versuche Plexiglasröhrchen Verwendung.

In einigen Kontrollversuchen wurden vor Auftragen der Probe das Persulfat und andere eventuell störende Verunreinigungen durch Elektrophorese von Puffer aus dem Gel entfernt[16]. Für dieses „Vorwaschen" der Gele wurde nicht der Elektrodenpuffer sondern der Gelpuffer benutzt, wodurch die Diskontinuität des Systems und damit die Trennleistung voll erhalten blieb.

6. Isolierung des Enzyms

Sämtliche Aufarbeitungsschritte wurden bei 4°C durchgeführt.

Essigsäurefällung

Die Präparation wurde auf pH 4,7 mit 0,2N Essigsäure eingestellt; dann wurde der Niederschlag abzentrifugiert, der dekantierte Überstand mit 1M Natriumphosphat-Puffer, pH 7,2, bis zu einem Gehalt von 50mM versetzt und mit 0,1N NaOH neutralisiert.

Adsorption von Begleitprotein an Hydroxylapatit[17]: 74 g Apatit pro g Protein wurden eingeschlämmt, der abzentrifugierte Apatit verworfen und der Überstand zur weiteren Aufarbeitung verwendet.

Die fraktionierte Ammoniumsulfatfällung wurde bei konstantem pH mit festem Ammoniumsulfat unter Zugrundelegen der Nomogramme von DIXON[18] und DIJESO[19] ausgeführt. Der pH-Wert wurde zwischen 7,0 und 7,2 durch sukzessives Zugeben von Natronlauge eingestellt. Kristallisation des Proteins erfolgte durch Zugeben von Ammoniumsulfat bis zur beginnenden Trübung der Enzympräparation und nachfolgendem dreitägigem Stehenlassen.

Die Entsalzung durch Gelfiltration[20] erfolgte an Sephadex G-25 oder Biogel P-10 in 10mM Natriumphosphat-Puffer, pH 7,0, zur weiteren Aufarbeitung am Ionenaustauscher, in 25mM Ammoniumformiat-Puffer, pH 8,5, zur anschließenden Gefriertrocknung.

Ionenaustauschchromatographie an DEAE-Cellulose: Vorbehandlung des Austauschers wie STAMBAUGH und POST[21], modifiziert durch die Verwendung von Phosphat-Puffer anstelle von Tris/HCl-Puffer. Gradientenelution: 20 m*l*: Puffer, pH 7,0, 10mM → Puffer, pH 6,0, 50mM; anschließend 50 m*l*: Puffer, pH 6,0, 50mM → 2M NaCl in Puffer, pH 6,0, 50mM.

Stabilisieren der gereinigten Präparation erfolgte durch Gefriertrocknung. Während des größten Teils der Trocknungszeit wurde das Trockengut auf −25°C gekühlt. Die Ampullen wurden unter Stickstoff abgeschmolzen und in der Tiefkühltruhe bei −25°C gelagert. Die von Boehringer, Mannheim GmbH bezogene Lactat-Dehydrogenase vom Rind wurde wie das Krebsenzym entsalzt und gefriergetrocknet.

7. Molekulargewichtsbestimmung

Das Molekulargewicht wurde durch Gelfiltration an Sephadex G-100 in Phosphat-Puffer, pH 7,0, 100mM nach den von ANDREWS[22] ausgearbeiteten Prinzipien bestimmt. (Säule: 70×1 cm). Durchflußgeschwindigkeit: 10 m*l*/Std.; 1-m*l*-Fraktionen.

8. Ausgleichs- und Fehlerrechnung

Die Berechnung der Regressionsgeraden erfolgte nach Formeln und Tabellenwerten aus WEBER[23]. Der Re-

[11] L. ORNSTEIN, Ann. New York Acad. Sci. **121**, 321 [1964].
[12] B. J. DAVIS, Ann. New York Acad. Sci. **121**, 404 [1964].
[13] A. A. DIETZ u. T. LUBRANO, Analyt. Biochem. [New York] **20**, 246 [1967].
[14] C. L. MARKERT u. F. MØLLER, Proc. nat. Acad. Sci. USA **45**, 753 [1959].
[15] C. J. EPSTEIN, M. M. CARTER u. R. F. GOLDBERGER, Biochim. biophysica Acta [Amsterdam] **92**, 391 [1964]; S. R. ANDERSON u. G. WEBER, Arch. Biochem. Biophysics **116**, 207 [1966].
[16] W. M. MITCHEL, Biochim. biophysica Acta [Amsterdam] **147**, 171 [1967].
[17] Dargestellt nach A. TISELIUS, S. HJERTÉN u. Ö. LEVIN, Arch. Biochem. Biophysics **65**, 132 [1956].
[18] M. DIXON, Biochem. J. **54**, 457 [1953].
[19] F. DIJESO, J. biol. Chemistry **243**, 2022 [1968].
[20] J. PORATH u. P. FLODIN, Nature [London] **183**, 1657 [1958].
[21] R. STAMBAUGH u. D. POST, J. biol. Chemistry **241**, 1462 [1966].
[22] P. ANDREWS, Biochem. J. **91**, 222 [1964]; **96**, 595 [1965].
[23] E. WEBER, Grundriß d. biol. Statistik f. Naturwissensch., Landw. u. Med., VEB G. Fischer, Jena 1961.

gressionskoeffizient wurde nur dann bestimmt, wenn entweder die x- oder die y-Werte als fehlerfrei vorgegeben waren.

Molekulargewicht: Bei der Bestimmung der Regressionsgeraden (Abb. 2) wurden die y-Werte ($=V_e$) als fehlerfrei vorgegeben. Die Zahlenangaben in Gleichung 1 sind Mittelwerte. Das Molekulargewicht liegt mit 99% Wahrscheinlichkeit im angegebenen Intervall.

Kinetische Konstanten: Auf die Verwendung einer statistischen Methode, die für den vorliegenden Fall sehr aufwendig wäre, konnte verzichtet werden. Stattdessen wurde eine graphische Auswertungsmethode benutzt, die die Genauigkeit einer statistischen Analyse erreicht[24].

Ergebnisse

1. Elektrophoretische Analyse der Rohextrakte verschiedener Organe

Unabhängig vom jeweils verwendeten Extraktionsmittel, Puffer- oder 35proz. Saccharoselösung, von der Vorbehandlung der Gele (s. S. 723) und vom Häutungsstadium des Tieres zeigten alle untersuchten Organe (Antennendrüse, Herz, Hoden, Samenblase, Enddarm und Schwanzmuskel) identische Lactat-Dehydrogenase-Pherogramme entsprechend Abb. 1b.

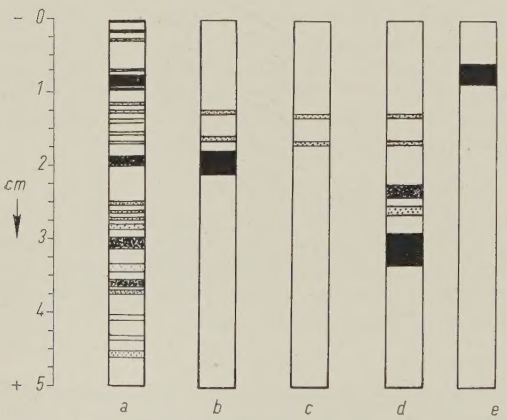


Abb. 1. Elektrophoretische Auftrennung der löslichen Proteine der Antennendrüse (60 µg Prot. + 30 mU Enzym/Gel) (a-d) und 300 mU kristalliner Rinder-Lactat-Dehydrogenase-5 (e); schematische Darstellung. a) mit Amidoschwarz unspezifisch angefärbte Proteine; b) Lactat-Dehydrogenase-spezifische Färbung; c) Anfärbung mit dem gleichen Färbemedium wie für b, d und e, jedoch ohne Substrat; d) Alkohol-Dehydrogenase-spezifische Färbung; e) Lactat-Dehydrogenase-spezifische Färbung.

Die beiden langsamer wandernden schwachen Banden erwiesen sich als Artefakte, da sie sich auch dann mit gleicher Intensität anfärbten, wenn Lactat oder/und $NAD^{\oplus}$ im Färbemedium fehlten. Das Auftreten solcher „nothing dehydrogenase"-Banden ist mehrfach beobachtet worden[13]. Die spezifische Anfärbung der Alkohol-Dehydrogenase-Aktivität zeigt hier keine Intensitätssteigerung dieser Banden (Abb. 1d).

Die Zahl der bei verschiedenen Wirbellosenarten gefundenen Lactat-Dehydrogenase-Banden reicht von eins bis zehn[25–33]. Alle diese Befunde enthalten jedoch mehrere Fehlerquellen[16,34]. In der vorliegenden Arbeit konnten diese Fehlerquellen ausgeschaltet werden; es wurde kein Hinweis auf das Vorliegen von Lactat-Dehydrogenase-Isoenzymen beim adulten Flußkrebs gefunden.

2. Reinigung der Lactat-Dehydrogenase

Der Trennungsgang wurde mit verschiedenem Ausgangsmaterial dreimal durchgeführt. Die Verwendung von DEAE-Cellulose erwies sich als überflüssig; mit dem in Tab. 1 zusammengestellten Reinigungsgang wurde das beste Ergebnis erzielt. Durch die Gefriertrocknung gingen 33% der Aktivität verloren. Das gefriergetrocknete Präparat zeigte innerhalb von zwei Jahren keinen Aktivitäts-

[24] G. W. SCHWERT, B. R. MILLER u. R. J. PEANASKY, J. biol. Chemistry **242**, 3245 [1967].

[25] A. K. HUGGINS u. K. A. MUNDAY, Advances comparat. Physiol. Biochem. **3**, 271 [1968].

[26] J. N. ARONSON, J. R. FISH u. F. A. MUCKENTALER Comparat. Biochem. Physiol. **24**, 657 [1968].

[27] H. LAUFER, Ann. New York Acad. Sci. **94**, 825 [1961].

[28] I. AGRELL u. B. KJELLBERG, Comparat. Biochem. Physiol. **16**, 515 [1965].

[29] D. G. DUSANIC, Exp. Parasitology **20**, 288 [1967].

[30] T. T. DUNAGAN u. ORLANDO DE LUQUE, J. Parasitology **52**, 727 [1966].

[31] E. CONDE-DEL-PINO, M. PÉREZ-VILAR u. A. A. CINTRÓN-RIVERA, Exp. Parasitology **18**, 320 [1966].

[32] R. A. BAYNE, L. HENDRICKS, F. BECKERDITE u. R. HARKEMA, Comparat. Biochem. Physiol. **24**, 275 [1968].

[33] E. GOLDBERG u. J. N. CATHER, J. cellular comparat. Physiol. **61**, 397 [1963].

[34] J. R. CANN u. W. B. GOAD, J. biol. Chemistry **240**, 148 [1965]; S. HJERTÉN, S. JERSTEDT u. A. TISELIUS, Analyt. Biochem. [New York] **11**, 219 [1965]; J. M. BREWER, Science [Washington] **156**, 256 [1967]; J. R. CANN u. W. B. GOAD, Ann. New York Acad. Sci. **151**, 638 [1968].

Tab. 1. Reinigung der Lactat-Dehydrogenase aus dem Abdominalmuskel von *Orconectes limosus*.
Das Ausgangsmaterial bildeten 675 g Schwanzmuskelfleisch von 330 Krebsen. — Der Testansatz für die Aktivitätsbestimmung enthielt 3mM Natriumpyruvat, 0,45mM NADH und vorverdünnte Präparation in 50mM Natriumphosphat-Puffer, pH 7,4. Testtemperatur: 25°C.

Reinigungsschritt	Protein [mg]	Aktivität [U]	Spezif. Aktivität [U/mg Prot.]	Ausbeute [%]
Rohhomogenat	75 000	13 000	0,175	100
34 000 × *g*-Überstand	19 200	12 500	0,65	95
Essigsäurefällung	11 300	11 000	0,97	88
Hydroxylapatit	6 400	10 000	1,57	76
1. Ammoniumsulfatfällung 1,72 — 2,55M (= 44 — 65%)	1 500	7 900	5,2	60
2. Ammoniumsulfatfällung 1,76 — 2,43M (= 45 — 62%)	440	6 600	15	50
3. Ammoniumsulfatfällung 2,0 — 2,31M (= 51 — 59%)	70 39*	3 500	49 89	27
Kristallisation	1,4 0,76*	78,5	56 103	6

* KJELDAHL-Aufschluß mit NESSLER-Reagenz.

abfall. Die Kristalle des Krebsenzyms gleichen in ihrem Aussehen den nadelförmigen Rinder-Lactat-Dehydrogenase-Kristallen[35]. Für die Pyruvat-Hydrogenierung beträgt die Umsatzzahl unter den in Tab. 1 angegebenen Testbedingungen 13500, d. i. $^1/_3$ bis $^1/_4$ der für das höchstgereinigte Wirbeltierenzym angegebenen Werte[36]. Die elektrophoretische Analyse zeigte eine einzige Proteinbande, deren Lage mit der der Lactat-Dehydrogenase-Aktivität übereinstimmte. Alle folgenden Untersuchungen wurden an der nach der dritten Ammoniumsulfatfällung erhaltenen Präparation durchgeführt.

3. Molekulargewicht

Die Gelfiltration einer 40 U Krebs- und 40 U Rinder-Lactat-Dehydrogenase enthaltenden Lösung lieferte einen einzigen, scharfen Aktivitätsgipfel, der 80% der aufgetragenen Gesamtaktivität enthielt; die Gelfiltration der Eichproteine lieferte die Werte für die Eichgerade der Abb. 2. 30 U Krebs-Lactat-Dehydrogenase mit 9 U Alkohol-Dehydrogenase als innerem Standard dienten der genauen Bestimmung des Elutionsvolumens für das Krebsenzym, das danach ein Molekulargewicht von 131000 ± 4000 hat.

Elektrophorese in Gegenwart von Harnstoff

Der Nachweis einer elektrophoretischen Einheitlichkeit oder Verschiedenheit eventuell vorhandener Untereinheiten des Enzymmoleküls gelang nicht.

4. Stabilität des Enzyms

Gereinigte Lactat-Dehydrogenase wurde durch Zusatz von 2% Rinderserumalbumin stabilisiert. 5 Min. Inkubation des Enzyms bei 25°C ergab im pH-Bereich von 3,5 bis 11,0 keinen Aktivitätsverlust. 20 Min. Vorinkubation bei 63°C hatte eine 50proz. Inaktivierung zur Folge.

Diese Halbinaktivierungstemperatur entspricht der unter gleichen Bedingungen für fast alle Fisch-, Amphibien-, Schildkröten- und Säuger-Lactat-Dehydrogenasen (H_4-Form[2]) erhaltenen, die bei einer großen Artenzahl untersucht worden ist[42]. Wesentlich höher ist die Temperaturstabilität bei Schlangen, Eidechsen, Vögeln[42] und *Trichinella*[29].

5. Reaktionskinetik

Proportionalität zwischen Enzymkonzentration und Enzymaktivität ist innerhalb des meßbaren Bereichs gegeben. Die verwendeten Substrate waren unter allen hier angegebenen Testbedingungen

[35] F. B. STRAUB, Biochem. J. **34**, 483 [1940].

[36] G. PFLEIDERER u. D. JECKEL, Biochem. Z. **329**, 370 [1957]; J. S. NISSELBAUM u. O. BODANSKY, J. biol. Chemistry **236**, 323 [1961].

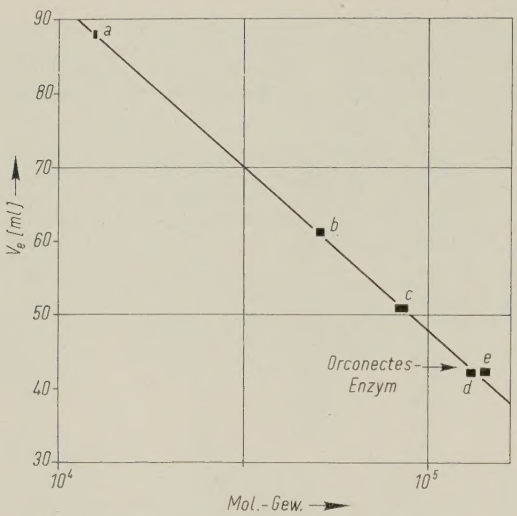


Abb. 2. Gelfiltration der Eichproteine und der *Orconectes*-Lactat-Dehydrogenase über Sephadex G-100. Abhängigkeit des Elutionsvolumens V_e der Proteine von deren Molekulargewicht. Die Eichgerade wird durch die Gleichung

$$1g\ (Mol.\text{-}Gew.) = 6{,}0913 - 0{,}0227 \cdot V_e \qquad (1)$$

beschrieben. a: Cytochrom *c** aus Pferdeherz[37]; b: Hämoglobin** vom Mensch[38]; c: Alkohol-Dehydrogenase* aus Pferdeleber[39]; d: Serumalbumin***, dimer vom Rind[40]; e: Lactat-Dehydrogenase* aus Rinderskelettmuskel[41].

stabil. DALZIEL[43] wies darauf hin, daß in den handelsüblichen $NAD^{\oplus}$- und NADH-Präparationen Verunreinigungen enthalten sein können, die zu großen Fehlern bei der Bestimmung kinetischer Konstanten führen. Einige vergleichende Versuche mit handelsüblichem und mit höchstgereinigtem $NAD^{\oplus}$ lieferten sowohl an der Krebs- als auch an der Rinder-Lactat-Dehydrogenase jeweils übereinstimmende Ergebnisse.

Spezifität: 1. D-Lactat wurde weder vom gereinigten Enzym noch von Rohextrakten der Antennendrüse meßbar umgesetzt. 2. Mit $NADP^{\oplus}$ zeigte das isolierte Enzym ebenfalls keine Aktivität.

Wahl eines geeigneten Puffersystems: Die In-vitro-Aktivität der Wirbeltier-Lactat-Dehydrogenase wird von der Ionenstärke[44,45] und der Ionenart[46] beeinflußt.

Ein Vergleich der Enzymaktivitäten in verschiedenen Puffern bei gleicher Ionenstärke von etwa 0,1 und gleichem pH (übrige Testbedingungen s. Abb. 3) zeigt, daß die Krebs- und die Rinder-Lactat-Dehydrogenase mit Pyruvat bei pH 6,8 im Universalpuffer nach THEORELL und STENHAGEN[47] und im Natrium- und Kalium-Phosphat-Puffer jeweils die gleiche Aktivität haben wie in Tris/HCl-Puffer, während in 2-Morpholinoäthylsulfonat-Puffer[48] die Aktivität des Krebsenzyms 50% niedriger ist. Lactat wird im Universalpuffer bei pH 8,6 vom Rinderenzym um 70% und vom Krebsenzym um 95% langsamer umgesetzt als in Tris/HCl- oder Kaliumphosphat-Puffer.

Im Bereich ihrer eigenen Pufferkapazität scheinen also von den untersuchten Puffern nur Tris/HCl und Kaliumphosphat zu vergleichbaren Ergebnissen zu führen. Alle folgenden Bestimmungen wurden je nach dem zu untersuchenden pH-Bereich in einem der beiden Puffer durchgeführt.

Hemmung durch hohe Substratkonzentration: Der Reaktionsablauf von der Pyruvatseite wird durch hohe Pyruvatkonzentrationen stark gehemmt, eine Erscheinung, die bei allen untersuchten Wirbeltier-Lactat-Dehydrogenasen[21, 45, 46, 49–54] vorkommt

* Boehringer Mannheim GmbH.
** Serva, Heidelberg.
*** Behring-Werke, Marburg.

[37] H. THEORELL u. A. ÅKESON, J. Amer. chem. Soc. **63**, 1804 [1941].
[38] T. MERRET, Biochim. biophysica Acta [Amsterdam] **124**, 389 [1966].
[39] A. EHRENBERG u. K. DALZIEL, Acta chem. scand. **12**, 465 [1958].
[40] R. W. HARTLEY, E. A. PETERSON u. H. A. SOBER, Biochemistry [Washington] **1**, 60 [1962].
[41] R. JAENICKE u. S. KNOF, Europ. J. Biochem. [Berlin] **4**, 157 [1968].
[42] A. C. WILSON, N. O. KAPLAN, L. LEVINE, A. PESCE, M. REICHLIN u. W. S. ALLISON, Federat. Proc. **23**, 1258 [1964].
[43] K. DALZIEL, Acta chem. scand. **11**, 1706 [1957].
[44] F. KUBOWITZ u. P. OTT, Biochem. Z. **314**, 94 [1943].
[45] M. T. HAKALA, A. J. GLAID u. G. W. SCHWERT, J. biol. Chemistry **221**, 191 [1956].
[46] A. D. WINER u. G. W. SCHWERT, J. biol. Chemistry **231**, 1065 [1958].
[47] T. THEORELL u. E. STENHAGEN, Biochem. Z. **299**, 416 [1938].
[48] N. E. GOOD, G. D. WINGET, W. WINTER, T. N. CONOLLY, S. IZAWA u. R. M. M. SINGH, Biochemistry [Washington] **5**, 467 [1966].
[49] N. O. KAPLAN, M. M. CIOTTI, M. HAMOLSKY u. R. E. BIEBER, Science [Washington] **131**, 392 [1960].
[50] P. G. W. PLAGEMANN, K. F. GREGORY u. F. WRÓBLEWSKI, Biochem. Z. **334**, 37 [1961].
[51] E. D. WACHSMUTH u. G. PFLEIDERER, Biochem. Z. **336**, 545 [1963].
[52] T. P. FONDY u. N. O. KAPLAN, Ann. New York Acad Sci. **119**, 888 [1965].
[53] E. S. VESELL, Nature [London] **210**, 421 [1965].
[54] E. S. VESELL u. P. E. POOL, Proc. nat. Acad. Sci. USA **55**, 756 [1966].

und auch schon für verschiedene andere Lactat-Dehydrogenasen[32,55,56] gefunden worden ist. Die für das Wirbeltierenzym beschriebene Abhängigkeit der Hemmung von der Temperatur[50,53,54] und dem pH[46,50,54] wurde auch bei dem Krebsenzym beobachtet.

Mit den unten angegebenen Pyruvatkonzentrationen wurde optimale Reaktionsgeschwindigkeit erzielt; oberhalb dieser Konzentrationen nahm die Geschwindigkeit wieder ab. Bei 25°C, pH 6,1: 1mM, pH 7,0: 2mM und pH 8,1: 20mM; bei pH 7,4, 15°C: 0,9mM, 35°C: 3,5mM; 44°C: 7mM; 54°C: 26mM.

Es entspricht damit in seiner Hemmbarkeit der M_4-Form der Wirbeltiere.

Die Reaktion zeigt in Gegenwart hoher Pyruvatkonzentrationen einen charakteristischen zeitlichen Verlauf. Die Anfangsgeschwindigkeit der Reaktion ist zunächst gleich der optimalen, fällt dann aber innerhalb von 60 bis 150 Sek. auf die zur jeweiligen Hemmstoffkonzentration gehörende und für mindestens 20 Min. konstant bleibende Geschwindigkeit ab. Entsprechende Vorgänge bei einer Wirbeltier-Lactat-Dehydrogenase sind auf die Bildung eines abortiven Enzym-$NAD^{\oplus}$-Pyruvat-Komplexes zurückgeführt worden[57]. Im Zusammenhang mit Produkthemmungsversuchen von der Lactatseite aus in Gegenwart von Pyruvat sind solche Komplexe schon länger bekannt[58, 59]; die Theorie ihrer Entstehung und möglichen Bedeutung im Stoffwechselgeschehen ist ausführlich diskutiert worden[60–63].

Mit den übrigen Substraten konnte keine Hemmung beobachtet werden. Getestet wurden $NAD^{\oplus}$ bis 10mM, NADH bis 0,8mM und Lactat bis 500mM.

pH-Optima: Für die Bestimmung von der Pyruvatseite aus wurde die Pyruvatkonzentration so niedrig gewählt, daß im untersuchten pH-Bereich eine Hemmung ausgeschlossen werden konnte. Mit höheren Konzentrationen verschiebt sich das pH-Optimum zu höheren pH-Werten hin, eine Tatsache, die von vielen Autoren nicht berücksichtigt worden ist. Der Einfluß des pH-Werts auf die Anfangsgeschwindigkeit der Reaktion von der Pyruvatseite und von der Lactatseite aus ist in Abb. 3 aufgezeichnet.

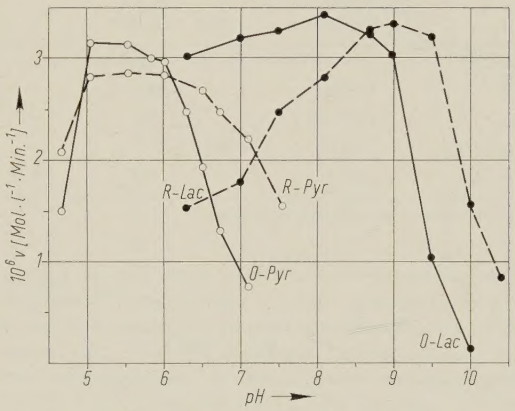


Abb. 3. pH-Optima der Lactat-Dehydrogenase von *Orconectes* (O) und vom Rind (M_4-Form) (R) bei 25°C. Testbedingungen: Bestimmung von der Pyruvatseite aus (Pyr): 0,07mM Pyruvat, 0,05mM NADH und Lactat-Dehydrogenase in 100mM Kaliumphosphat-Puffer, 4-cm-Küvetten. Bestimmung von der Lactatseite aus (Lac) 50mM Lactat, 1mM $NAD^{\oplus}$ und Lactat-Dehydrogenase in 100mM Tris/HCl-Puffer, 4-cm-Küvetten. Die Enzym-Konzentrationen der vier Testreihen waren unterschiedlich; die Anfangsgeschwindigkeit v wurde nicht auf einheitliche Enzymkonzentration umgerechnet.

Die pH-Optima des Krebs- und des Rinderenzyms für die Reaktion von der Pyruvatseite aus stimmen nahezu überein. Der optimale pH-Wert für die Lactat-Dehydrogenierung ist für das Krebsenzym um eine Einheit niedriger als für die Rinder-Lactat-Dehydrogenase. Bemerkenswert ist die völlige Übereinstimmung der pH-Optima der M_4-Form des Rinderenzyms mit den von Winer und Schwert[46] für die H_4-Form gefundenen.

Da diese Autoren die einzigen sind, die bei ihren Messungen die pH-Abhängigkeit der Pyruvathemmung berücksichtigt haben, sind alle übrigen in der Literatur zu findenden Angaben über das pH-Optimum der Pyruvat-

[55] T. E. Mansour u. E. Bueding, Brit. J. Pharmacol. Chemotherapy **8**, 431 [1953].

[56] A. Yoshida, Biochim. biophysica Acta [Amsterdam] **99**, 66 [1965].

[57] H. Gutfreund, R. Cantwell, C. H. McMurray, R. S. Criddle u. G. Hathaway, Biochem. J. **106**, 683 [1968].

[58] V. Zewe u. J. Fromm, J. biol. Chemistry **237**, 1668 [1962].

[59] S. Anderson, J. R. Florini u. C. S. Vestling, J. biol. Chemistry **239**, 2991 [1964].

[60] V. Bloomfield u. R. A. Alberty, J. biol. Chemistry **238**, 2817 [1963].

[61] W. W. Cleland, Biochim. biophysica Acta [Amsterdam] **67**, 173 [1963].

[62] W. W. Cleland, Biochim. biophysica Acta [Amsterdam] **67**, 188 [1963].

[63] C. Walter u. E. Frieden, Advances Enzymol. **25**, 167 [1963].

Tab. 2. Kinetische Konstanten für die *Orconectes*-Lactat-Dehydrogenase und die Rinder-Lactat-Dehydrogenase-5; Vergleich mit Literaturwerten für verschiedene Lactat-Dehydrogenasen.

		Orconectes		Rind Skelettmuskel	Rind Herzmuskel[24, *]			Ratte Leber[59]	Kaninchen Skelettmuskel[72]
Temperatur	[°C]	25		25	28			25	28
	pH	5,5	8,1	8,1	5,5	8,1	9,0	8,6	7,15
K_D	[10^5M]	—	62	7,6	—	3,2	3,2	16	17
K_L	[mM]	—	38	5,6	—	2,5	2,4	24	11
K_{DL}	[μM^2]	—	120	2,0	—	0,3	0,5	11	5,1
K_{DH}	[10^5M]	3,0	1,3	—	1,7	1,7	1,5	1,5	0,74
K_P	[10^5M]	5,5	338	—	5,9	35	240	66	21
K_{DHP}	[10^8M^2]	0,05	0,96	—	0,02	0,2	1,4	0,89	0,11
V_h/V_r			0,37	—	—	0,26	0,24	0,47	0,21
K_{eq}^{app}	[10^5M]	—	29,4	—		17		120	5,3
K_{eq}	[10^{12}M]	—	2,3	—		4—13		3,0	3,8
K_{DHP}/K_P	[μM]	9,4	28	—	2,7	5,7	5,8	13,5	5,5
K_{DL}/K_L	[mM]	—	3,2	0,36	—	0,12	0,2	0,15	0,47

* Graphischen Darstellungen entnommen.

Hydrogenierung[44, 51, 55, 64–66] zu hoch. Für die Lactat-Dehydrogenierung durch verschiedene Wirbeltier-Lactat-Dehydrogenasen werden pH-Werte zwischen 9 und 10,8 als optimal angegeben[46, 59, 64, 67]. Die Lactat-Dehydrogenase von *Trichinella* dehydrogeniert bei pH 9,0[29] und von *Schistosoma* bei pH 8,2 bis 8,9[55] am schnellsten.

*Kinetische Konstanten und Reaktionsmechanismus**:* Es sei nochmals auf die Ausführungen von SCHWERT et al.[24] verwiesen, denen hier im wesent-

** Verwendete Abkürzungen:

v = Anfangsgeschwindigkeit
V_h = Maximalgeschwindigkeit der Lactat-Dehydrogenierung (= Hirnreaktion)
V_r = Maximalgeschwindigkeit der Pyruvat-Hydrogenierung (= Rückreaktion)

D = [$NAD^{\oplus}$] K_D
DH = [NADH] K_{DH}
L = [Lactat] K_L
P = [Pyruvat] K_P
} Entsprechende scheinbare MICHAELIS-Konstanten[68–70]

K_{DL}
K_{DHP}
} Konstanten für die entsprechenden Ternärkomplexe[68–70]

[64] J. CLAUSEN u. B. ØVLISEN, Biochem. J. **97**, 513 [1965].
[65] G. LAUDAHN, Biochem. Z. **337**, 449 [1963].
[66] B. BORREBAEK, S. ABRAHAM u. I. L. CHAIKOFF, Biochim. biophysica Acta [Amsterdam] **96**, 237 [1965].
[67] G. SIEBERT, K. H. BÄSSLER u. A. SCHMITT, Biochem. Z. **336**, 402 [1962].
[68] R. A. ALBERTY, J. Amer. chem. Soc. **75**, 1928 [1953].
[69] C. FRIEDEN, J. Amer. chem. Soc. **79**, 1894 [1957].
[70] K. DALZIEL, Acta chem. scand. **11**, 1706 [1957].

▶

Abb. 4. Anfangsgeschwindigkeit v der Lactat-Dehydrogenierung bei pH 8,1. Darstellung der Meßwerte im Diagramm entsprechend Gl. 2 und 2a (Abb. 4a, b). Die Konzentration beider Substrate wurde variiert. Die Geraden der Abb. 4a verbinden die Punkte gleicher $NAD^{\oplus}$-, der Abb. 4b die Punkte gleicher Lactat-Konzentrationen. Mit Hilfe der Regressionsgeraden (hier nicht abgebildet!) der Meßpunkte wurden die Punkte der Abb. 4c und d ermittelt.

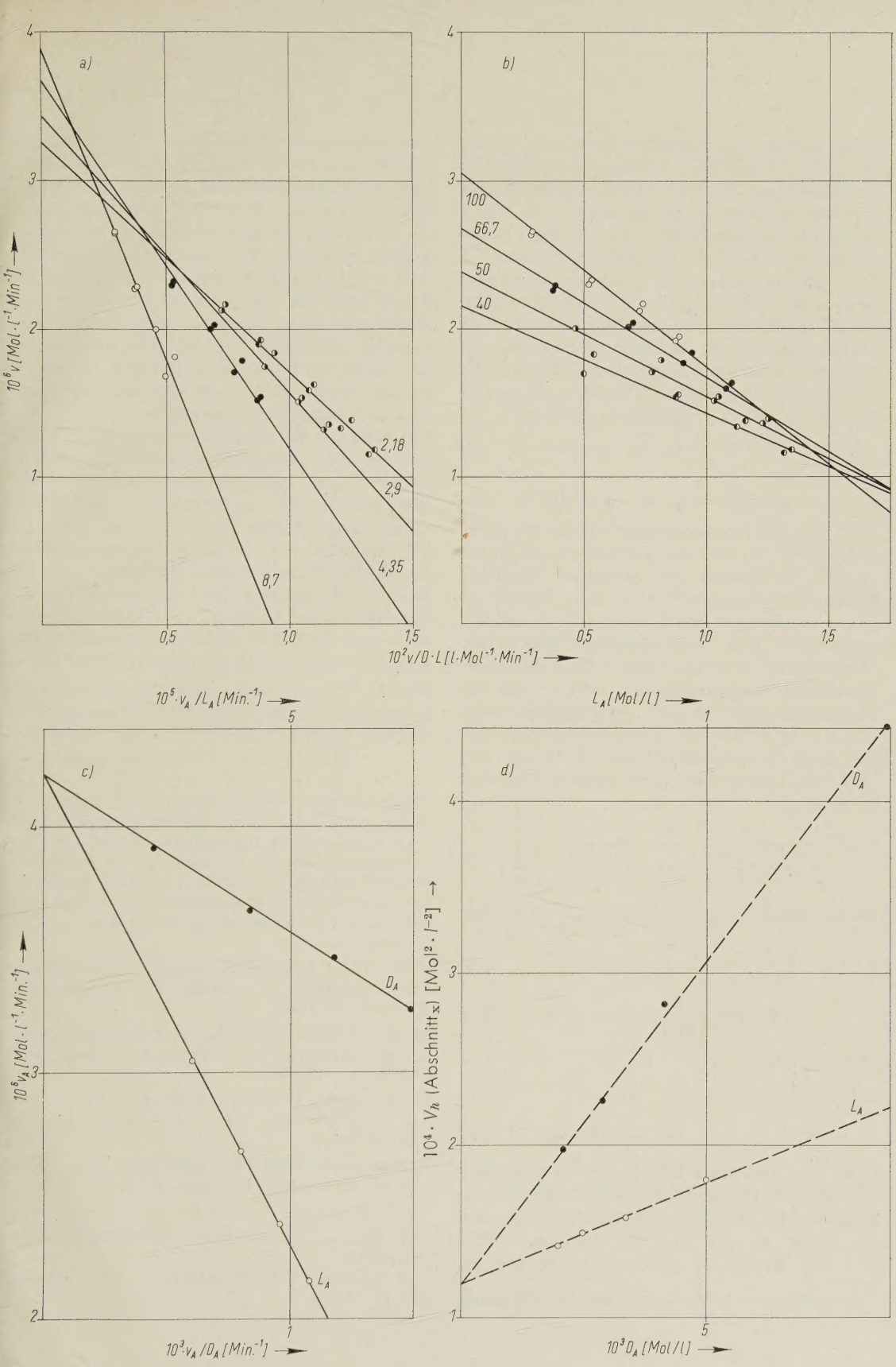
a) Die Anfangskonzentrationen d. $NAD^{\oplus}$ sind in mMol/l an den Kurven angegeben. Die Lactatkonzentrationen sind für gleiche Meßpunkte wie in Abb. 4b. Die Punkte sind Meßpunkte, die Geraden sind mit den ermittelten Konstanten (Tab. 2) nach Gleichung 2 berechnet. ○ = 8,7mM; ◐ = 2,18mM; ◑ = 2,9mM; ● = 4,35mM.

b) Die Anfangskonzentrationen des Lactats sind in mMol/l an den Kurven angegeben. Die $NAD^{\oplus}$-Konzentrationen sind für gleiche Meßpunkte wie in Abb. 4a. Die Geraden sind mit den ermittelten Konstanten (Tab. 2) nach Gl. 2a berechnet. ○ = 100mM; ◐ = 40mM; ◑ = 50mM; ● = 66,7mM.

c) Diagramm der Ordinatenabschnitte v_A der Abb. 4a bzw. Abb. 4b gegen die Quotienten aus diesen Ordinatenabschnitten und der zugehörigen $NAD^{\oplus}$-Konzentration D_A bzw. Lactatkonzentration L_A. Aus diesem Diagramm: $V_h = 4{,}21 \cdot 10^{-6}$ [Mol · l^{-1} · Min.$^{-1}$], $K_D = 6{,}35 \cdot 10^{-4}$M und $K_L = 3{,}86 \cdot 10^{-2}$M.

d) Diagramm der Quotienten aus V_h und den Abszissenabschnitten (Abschnitt$_x$) der Abb. 4a bzw. 4b gegen die zugehörige $NAD^{\oplus}$-Konzentration D_A bzw. Lactatkonzentration L_A.

Aus diesem Diagramm: $K_{DL} = 1{,}19 \cdot 10^{-4}M^2$, $K_D = 6{,}12 \cdot 10^{-4}$M und $K_L = 3{,}76 \cdot 10^{-2}$M.


a)
b)
c)
d)
$10^6 \cdot V\,[Mol \cdot l^{-1} \cdot Min^{-1}] \rightarrow$
$10^2 v/D \cdot L\,[l \cdot Mol^{-1} \cdot Min^{-1}] \rightarrow$
$10^5 \cdot v_A / L_A\,[Min.^{-1}] \rightarrow$
$L_A\,[Mol/l] \rightarrow$
$10^6 V_A\,[Mol \cdot l^{-1} \cdot Min^{-1}] \rightarrow$
$10^3 \cdot v_A / D_A\,[Min.^{-1}] \rightarrow$
$10^4 \cdot V_h$ (Abschnitt$_{xl}$) $[Mol^2 \cdot l^{-2}] \rightarrow$
$10^3 D_A\,[Mol/l] \rightarrow$
2,18
2,9
4,35
8,7
100
66,7
50
40
D_A
L_A

lichen gefolgt wird. Sämtliche Messungen wurden bei 25°C durchgeführt. Anfangsgeschwindigkeitsuntersuchungen der Lactat-Dehydrogenierung bei variablen Substratkonzentrationen sind in Abb. 4 dargestellt. Entsprechende Untersuchungen lieferten die übrigen in Tab. 2 aufgeführten Werte.

Die unter Verwendung der ermittelten kinetischen Konstanten (Tab. 2) nach Gl. (2) und (2a) berechneten Geraden stimmen zufriedenstellend mit den Meßpunkten überein. Bewiesen wird dadurch für die Krebs-Lactat-Dehydrogenase die Gültigkeit der von ALBERTY[68] aufgestellten Gleichung, die im vorliegenden v, $v/D \cdot L$-Diagramm die Formen

$$v = (V_h - K_D \cdot v/D) - (K_L \cdot D + K_{DL})\, v/D \cdot L \qquad (2)$$

(Abb. 4a) und

$$v = (V_h - K_L \cdot v/L) - (K_D \cdot L + K_{DL})\, v/D \cdot L \qquad (2a)$$

(Abb. 4b) hat. Entsprechendes gilt für die Rückreaktion. Gl. (2) und (2a) beschreiben zwei grundsätzlich verschiedene der prinzipiell möglichen Reaktionsmechanismen[68,70]: 1. den „*random sequence mechanism*" und 2. den „*ordered sequence mechanism*". Eine Unterscheidung dieser beiden Mechanismen ist möglich durch die Analyse von Produkthemmungsversuchen[71]. Abb. 5 zeigt die Ergebnisse solcher Versuche, die in Gegenwart von NADH von der Lactatseite aus durchgeführt wurden. Liegt ein „*ordered sequence mechanism*" vor, in dem das Coenzym das zuerst gebundene Substrat ist, dann gilt[71]

$$v = \frac{V_h}{1 + \frac{K_L}{L} + \left(\frac{K_P}{K_{DH\,P}} \cdot DH + 1\right)\left(\frac{K_D}{D} + \frac{K_{DL}}{D \cdot L}\right)}. \qquad (3)$$

Im vorliegenden Diagramm hat Gl. (3) die Formen

$$v = V_h - \left(\frac{K_P}{K_{DH\,P}} \cdot DH + 1\right) K_D \cdot v/D - \left(K_L \cdot D + \left(\frac{K_P}{K_{DH\,P}} \cdot DH + 1\right) K_{DL}\right) v/D \cdot L \qquad (4)$$

(Abb. 5a) und

$$v = V_h - K_L \cdot v/L - \left(\frac{K_P}{K_{DH\,P}} \cdot DH + 1\right)(K_D \cdot L + K_{DL})\, v/D \cdot L \qquad (4a)$$

(Abb. 5b). Aus diesen Gleichungen ist ersichtlich, daß der Wert für K_L gegenüber der ungehemmten Reaktion (Gl. (2), (2a)) unverändert ist, während die Werte für K_D und K_{DL} um den Faktor $(1 + DH \cdot K_P/K_{DH\,P})$ größer sind. Die aus den Produkthemmungsdaten ermittelten Konstanten erfüllen diese Forderungen. K_L ist tatsächlich praktisch unverändert geblieben und die Dissoziationskonstante für den Enzym-NADH-Komplex $K_{DH\,P}/K_P$ stimmt gut mit dem aus der Pyruvat-NADH-Kinetik erhaltenen Wert überein (vgl. Legende zu Abb. 5 und Tab. 2). Mit großer Wahrscheinlichkeit dürfte somit die von der Krebs-Lactat-Dehydrogenase katalysierte Reaktion nach dem „*ordered sequence mechanism*" ablaufen, und zwar derart, daß zuerst das Coenzym an das freie Enzym gebunden werden muß, bevor eine Anlagerung des zweiten Substrates erfolgen kann.

Mit Hilfe von Produkthemmungsversuchen wurde für die von Lactat-Dehydrogenase aus Kaninchen-[58,72] und aus Rattenskelettmuskel[59] katalysierte Reaktion ein „*ordered sequence mechanism*" nachgewiesen, in dem das Coenzym das zuerst gebundene Substrat ist und ein oder mehrere kinetisch bedeutsame Ternärkomplexe auftreten.

Nach Gl. (4) und (4a) ergibt sich mit den Werten aus Abb. 5c und 5d für $(1 + K_P\,(DH)/K_{DH\,P})$ ein Wert von 2,12. Für die Dissoziationskonstante $K_{DH\,P}/K_P$ folgt daraus ein Wert von $2{,}98 \cdot 10^{-5}$M. K_{DL}/K_L bzw. $K_{DH\,P}/K_P$ sind die Dissoziationskonstanten für den Enzym-$NAD^{\oplus}$-Komplex bzw. Enzym-NADH-Komplex[69,70,73]. Für die schein-

▶

Abb. 5. Produkthemmungsversuche. Anfangsgeschwindigkeit v der Lactat-Dehydrogenierung bei pH 8,1 und $3{,}33 \cdot 10^{-5}$M NADH-Anfangskonzentration. (Die Enzymkonzentration war von derjenigen in Abb. 4 verschieden, vgl. Legende zu Abb. 4). Mit Hilfe der Regressionsgeraden (hier nicht abgebildet!) der Meßpunkte in Abb. 5a und b wurden die Punkte der Abb. 5c und d ermittelt.

a) Die $NAD^{\oplus}$-Konzentrationen sind in mMol/l an den Kurven angegeben: ○ = 10mM; ◐ = 3,33mM; ● = 2,0mM; ◑ = 1,43mM.

b) Die Lactatkonzentrationen sind in mMol/l an den Kurven angegeben: ○ = 100mM; ◐ = 50mM; ● = 33,3mM; ◑ = 25mM.

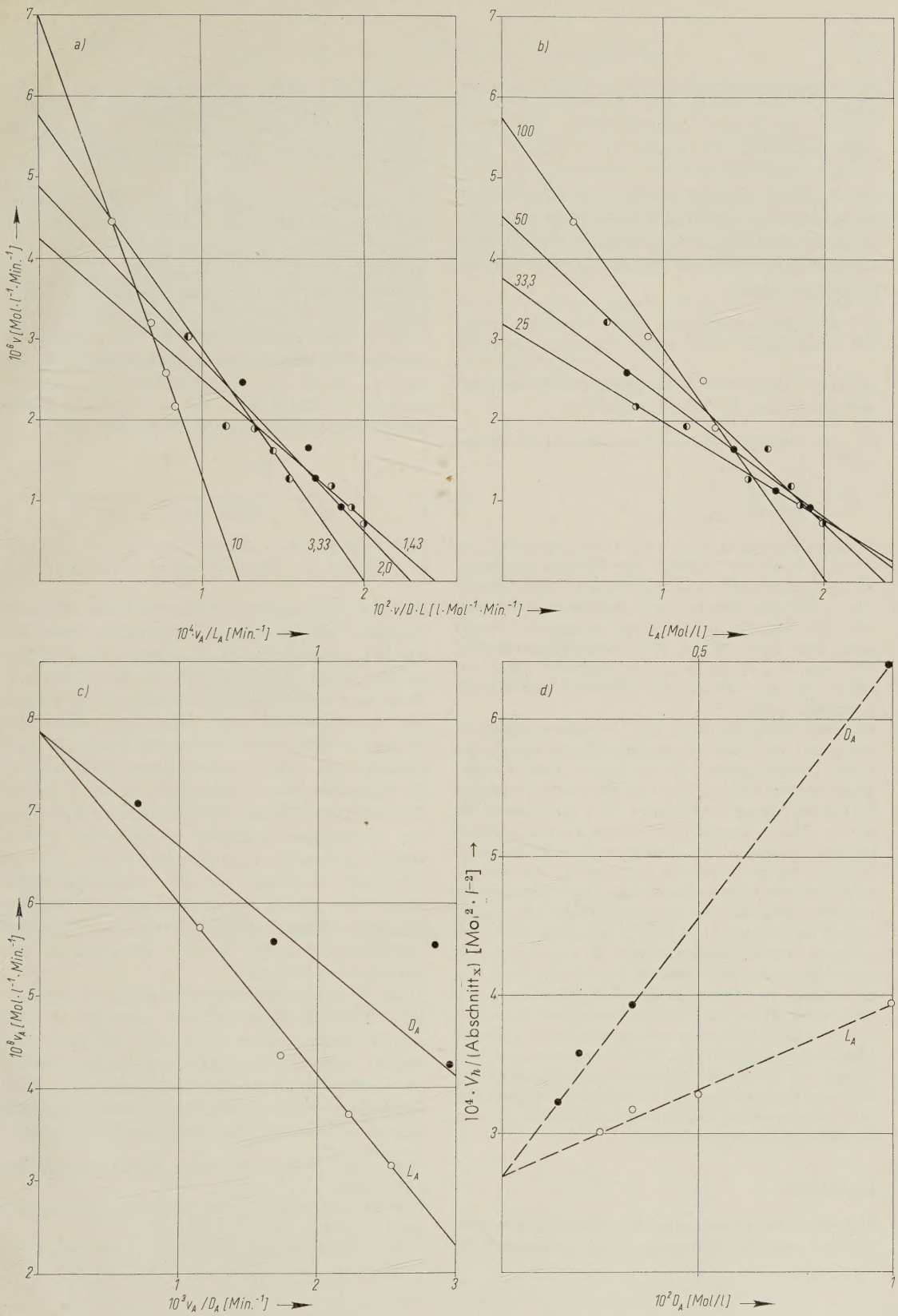
c) Aus diesem Diagramm ergibt sich: $V_h = 7{,}88 \cdot 10^{-6}$ Mol $\cdot\, l^{-1} \cdot$ Min.$^{-1}$, $K_D = 12{,}4 \cdot 10^{-4}$M und $K_L = 3{,}70 \cdot 10^{-2}$M.

d) Aus diesem Diagramm ergibt sich: $K_{DL} = 2{,}70 \cdot 10^{-4}$M^2, $K_D = 12{,}0 \cdot 10^{-4}$M und $K_L = 3{,}70 \cdot 10^{-2}$M.

[71] R. A. ALBERTY, J. Amer. chem. Soc. **80**, 1777 [1958].

[72] V. ZEWE u. J. FROMM, Biochemistry [Washington] **4**, 782 [1965].

[73] Y. TAKENAKA u. G. W. SCHWERT, J. biol. Chemistry **223**, 157 [1956].


a)
b)
c)
d)
10
3,33
1,43
2,0
100
50
33,3
25
$10^6 \cdot v\,[Mol \cdot l^{-1} \cdot Min.^{-1}]$
$10^2 \cdot v/D \cdot L\,[l \cdot Mol^{-1} \cdot Min.^{-1}]$
$10^4 \cdot v_A/L_A\,[Min.^{-1}]$
$L_A\,[Mol/l]$
$10^6 v_A\,[Mol \cdot l^{-1} \cdot Min.^{-1}]$
$10^3 v_A/D_A\,[Min.^{-1}]$
D_A
L_A
$10^4 \cdot V_h/(Abschnitt_X)\,[Mol^2 \cdot l^{-2}]$
$10^2 D_A\,[Mol/l]$

bare Gleichgewichtskonstante der Gesamtreaktion gilt[68]

$$K_{eq}^{app} = \frac{V_h \cdot K_{DHP}}{V_r \cdot K_{DL}} \quad (5)$$

WINER und SCHWERT[46] und SCHWERT et al.[24] haben bei Rinder-Lactat-Dehydrogenase-1 die Rolle des an der Gesamtreaktion beteiligten Protons ausführlich untersucht und für die „wahre" Gleichgewichtskonstante

$$K_{eq} = \frac{V_h \cdot K_{DHP}}{V_r \cdot K_{DL}} \cdot [H^{\oplus}] \quad (6)$$

gefunden. Die Werte für die genannten Konstanten sind am Schluß der Tab. 2 aufgeführt.

Für den THEORELL-CHANCE-Mechanismus gilt zusätzlich[68]

$$K_{eq}^{app} = \frac{V_h^3 \cdot K_{DH} \cdot K_P}{V_r^3 \cdot K_D \cdot K_L} \quad (7)$$

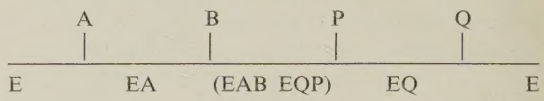
Für das Krebsenzym erhält man danach einen Wert von $K_{eq} = 5{,}4 \cdot 10^{-12}$M. Infolge der Fehlerfortpflanzung wird K_{eq} jedoch mit einem recht hohen Fehler behaftet sein, so daß dieser Wert nicht als signifikant verschieden von dem nach Gl. 6 berechneten angesehen werden kann. Erst durch weitere Produkthemmungsversuche, z. B. von der Lactatseite aus in Gegenwart von Pyruvat[71], wird eine Klärung der Ternärkomplex-Kinetik ermöglicht werden.

Bei einem Vergleich der in Tab. 2 zusammengestellten Werte fällt auf, daß die Konstanten K_D und K_{DL} für die Lactat-Dehydrogenase von *Orconectes* etwa 8- bzw. 60mal so groß sind wie die unter gleichen Bedingungen für das Rinderenzym ermittelten; die Literaturwerte für die in Tab. 2 angegebenen Säuger-Lactat-Dehydrogenasen werden um das ungefähr 4- bis 20fache bzw. 20- bis 400fache übertroffen, während der Wert für K_L im Bereich der Literaturwerte liegt. Zumindest eine der Ursachen dafür ist in der geringeren Affinität des Krebsenzyms zum Coenzym bei pH 8,1 zu suchen, die in den erhöhten Dissoziationskonstanten für den Enzym-Coenzym-Komplex zum Ausdruck kommt. Bei pH 8,1 ist die Affinität zum Coenzym etwa 7- bis 27mal so gering wie die der übrigen Lactat-Dehydrogenasen. Im Gegensatz dazu zeigt die Pyruvat-Hydrogenierung weitgehende Übereinstimmung mit dem Wirbeltierenzym. Das Verhältnis der maximalen Reaktionsgeschwindigkeit der Hin- und Rückreaktion $V_h : V_r$ sowie das Gleichgewicht der Gesamtreaktion K_{eq} entsprechen ebenfalls den von Wirbeltieren bekannten Werten.

Diskussion

Mit der Übereinstimmung der Molekulargewichte der L-Lactat-Dehydrogenase aus Bakterien[42,56], Crustaceen[42] und Wirbeltieren[41] steht dieses Enzym im Gegensatz z. B. zur Alkohol-Dehydrogenase, deren Molekülgröße[3,74] im Laufe der Evolution offenbar mehrfach stark verändert worden ist.

Die kinetischen Eigenschaften der Lactat-Dehydrogenase des Flußkrebses stimmen mit denen des Wirbeltierenzyms weitgehend überein. Eine Abweichung besteht in der geringeren Affinität des Krebsenzyms zum Coenzym. Nach der Nomenklatur von CLELAND[75] ist der Mechanismus der Lactat-Dehydrogenase-Reaktion bei *Orconectes* wie bei den bisher untersuchten Wirbeltieren als *Ordered Bi Bi* mit dem Coenzym als „*leading reactant*" zu bezeichnen, der in CLELAND's Kurzschriftweise folgendermaßen dargestellt wird:



Hier bedeuten E = freies Enzym, A = $NAD^{\oplus}$, B = Lactat, P = Pyruvat und Q = NADH.

Die Verwendung der am Rohextrakt oder isolierten Enzym in vitro gewonnenen kinetischen Daten für eine Interpretation der in vivo ablaufenden Prozesse ist zum großen Teil spekulativ. So lassen sich pH-Werte und Substratkonzentrationen für die einzelnen Kompartimente der Zelle nicht definieren. Zudem werden kinetische Untersuchungen im allgemeinen an Enzympräparationen durchgeführt, die gegenüber den Verhältnissen in der lebenden Zelle extrem verdünnt sind. Die in dieser Arbeit für die kinetischen Analysen verwendeten Lactat-Dehydrogenase-Konzentrationen waren bis zu 50000fach niedriger als im Ausgangsgewebe. SRERE[76] hat darauf aufmerksam gemacht, daß die kinetischen Eigenschaften des hoch- und des extrem niedrigkonzentrierten Enzyms grundlegend verschieden sein können.

Trotz dieser grundsätzlichen Bedenken ist von einigen Forschergruppen von einer einzelnen in vitro ermittelten kinetischen Eigenschaft, der mehr oder minder starken Pyruvathemmbarkeit der Wirbeltier-Lactat-Dehydrogenase-Isoenzyme, eine stoffwechselphysiologische Bedeutung dieser Isoenzyme abgeleitet worden. Eine zusammenfassende Dar-

[74] W. SOFER u. H. URSPRUNG, J. biol. Chemistry **243**, 3110 [1968].

[75] W. W. CLELAND, Biochim. biophysica Acta [Amsterdam] **67**, 104 [1963].

[76] B. A. SRERE, Science [Washington] **158**, 963 [1967].

stellung zu diesem Thema hat DRUMMOND[77] gegeben; die Hypothese befürwortende und ablehnende Arbeiten sind gegenübergestellt worden. Dem Flußkrebs fehlt offenbar diese funktionelle Differenzierung der Lactat-Dehydrogenase. Das Krebsenzym entspricht in seiner Pyruvathemmbarkeit der M_4-Form. Es kommt sowohl im recht selten tätigen Abdominalmuskel als auch im rhythmisch tätigen Herzmuskel in hoher Konzentration vor[1]. KELLER[1] konnte zeigen, daß Herz- und Skelettmuskel stoffwechselphysiologische Unterschiede aufweisen, die sogar noch stärker ausgeprägt sind als bei den entsprechenden Organen der Wirbeltiere. Es sieht so aus, als ob das Fehlen von kinetisch differenzierten Lactat-Dehydrogenase-Isoenzymen, die den stoffwechselphysiologischen Anforderungen der einzelnen Organe angepaßt sind, keine Benachteiligung in der Fähigkeit optimaler energetischer Ausnutzung der Substrate bedeutet.

[77] G. I. DRUMMOND, Fortschr. Zool. **18**, 359 [1967].

Meinem verehrten Lehrer Prof. Dr. K. URICH danke ich für die Anregung zu der vorliegenden Arbeit, für das Interesse an ihrem Fortgang sowie für die Kritik bei ihrer Abfassung.

1. Referent: Prof. Dr. Urich
2. " Prof. Dr. Kümmel

Tag der mündl. Prüfung: 19.12.68

Tag der Promotion: 27.5.69